

# MONIPAIKKAISEN MINIFERMENTORIN VALIDOINTI MIKROBIOLOGISIIN MÄÄRITYKSIIN

Virpi Hakonen

Opinnäytetyö  
Toukokuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma  
Tekniikan ja liikenteen ala



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU  
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



Tekijä(t) HAKONEN, Virpi	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 27.05.2011
	Sivumäärä 38	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus ( ) saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty ( X )
Työn nimi MONIPAIIKAISEN MINIFERMENTORIN VALIDOINTI MIKROBIOLOGISIIN MÄÄRITYKSIIN		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) JANSSON, Kristian, asiantuntija SALO, Esa, Lehtori		
Toimeksiantaja(t) Samplion Oy Juha Mentu, Avainasiakaspäällikkö, mikrobiologi		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Samplion Oy:n toimeksiannosta Jyväskylän ammattikorkeakoulun kemian laboratorion tiloissa. Työn tavoitteena oli validoida putkimenetelmän sovelluksena kehitetty PMEUI-laitteisto (Portable Microbe Enrichment Unit). PMEUI-tulosten vertailua varten työssä tehtiin myös rinnalla mikrobiviljelyitä pesäkeluku-menetelmällä käyttäen Petrifilm-kasvatusalustaa. Tarkoituksena oli tarkistaa PMEUI-laitteiston toimivuus kvantitatiivisessa mikrobiologisessa määrittämisessä valmista bakteerisuspensiota käyttäen.</p> <p>Putkimenetelmää käytetään vesinäytteiden bakteriologisessa tutkimuksessa. Liuosputkissa olevista näytteistä tai niiden laimennoksista on tarkoitus saada vain osaan positiivinen ja osaan negatiivinen tulos, jotta mikrobien lukumäärä voidaan laskea. Määrittäminen perustuu oletuksiin, että mikrobit ovat hajautuneet sattumanvaraisesti näytteeseen ja jokainen solu pystyy yksin panemaan putkessa alulle positiivisen reaktion. Näin saadaan MPN (Most probable number).</p> <p>Pesäkelukumenetelmällä näytteen laimennosta pipetoitiin kasvualustalle, tässä työssä Petrifilmille. Inkuboinnin jälkeen laskettiin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) lukumäärä millilitrassa näytettä. Kasvatusalustoille haettiin sopivaa laimennostasoa, jotta pesäkkeiden määrä oli n. 30 – 100 PMY.</p> <p>Tuloksien mukaan tehty kuvaaja ei ollut odotettu. Oletettavasti <i>E.coli</i>-bakteerikannan muuntuminen johti saatuihin, epäluotettaviin tuloksiin. Muuntuminen johtui todennäköisesti siitä, että käytettiin aina edellisestä mittauksesta saatua kantaa seuraavaan analyysiin, jonka seurauksena tapahtui selektiota ja bakteerikannan kasvunopeus kasvoi. Tästä seuraa se, että kasvu näkyy aikaisemmin, mitä pidemmälle mennään analyyseissä ja saadaan enemmän positiivisia tuloksia saman kasvatusajan jälkeen.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Kvantitatiivinen mikrobiologinen määrittäminen, validointi, PMEUI-laitteisto, MPN-menetelmä		
Muut tiedot		



Author(s) HAKONEN, Virpi	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 27052011
	Pages 38	Language Finnish
	Confidential ( ) Until	Permission for web publication ( X )
Title  Validation of the multi-site mini-fermentor for microbiological determinations		
Degree Programme Laboratory sciences		
Tutor(s) JANSSON, Kristian, specialist SALO, Esa, lecturer		
Assigned by Samplion Oy Juha Mentu, Key Account Manager, Microbiologist		
<p>Abstract</p> <p>This thesis project was carried out as the assignment from Samplion Oy in the facilities of Jyväskylä University of Applied Sciences chemistry laboratory. The goal of the thesis work was to validate the PMEÜ equipment which is developed as an application of the MPN method. To compare the PMEÜ results there were done alongside microbe cultivation by the plate count method using a Petrifilm cultivation medium. The idea was to verify the functionality of the PMEÜ equipment in quantitative microbiological assay using a prepared bacteria suspension.</p> <p>The tubing method is used in bacteriologic research of water samples. From the samples in the tubes or their dilutions the purpose was to get in part of them a positive reaction and in the other part a negative reaction so that the number of microbes could be counted. Determination is based on the hypothesis that microbes are spread out randomly into the sample and that every cell can itself start a positive reaction in the tube. This is how you get the MPN (Most probable number).</p> <p>In the plate count method the dilution of the sample is pipetted to the cultivation medium, in this thesis project to a Petrifilm. After incubation there were counted the number of colony forming units (CFU) in a milliliter of the sample. The most suitable dilution was searched so that the number of colonies would be around 30- 100 CFU.</p> <p>The graphic which was made from the results was not expected. Supposedly the transformation of the <i>E.coli</i> stock led to unreliable results. Transformation was supposedly caused by the fact that the stock got from the previous analysis was always used for the next one and this led to selection and to increasing growth rate of the stock. From this follows that the growth can be seen earlier the further the analyses go and after the growth time, more positive results can be observed.</p>		
Keywords Quantitative microbiological assay, validation, PMEÜ equipment, MPN method		
Miscellaneous		

# SISÄLTÖ

<b>1 OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET .....</b>	<b>3</b>
<b>2 MENETELMÄT JA SOVELLUKSET .....</b>	<b>3</b>
2.1 MPN-menetelmä .....	3
2.2 PMEU-laitteisto .....	5
2.3 Pesäkelukumenetelmä .....	7
2.4 Petrifilm-kasvatusalusta .....	7
2.5 ATP-määrittäminen .....	8
<b>3 KÄYTÄNNÖN SUORITUS .....</b>	<b>8</b>
3.1 Viljelmien käyttöönotto .....	8
3.2 ATP-määrittäminen .....	10
3.3 Laimennosten valmistus .....	10
3.3.1 Putkimenetelmä .....	11
3.3.2 Pesäkelukumenetelmä .....	12
<b>4 TULOKSET .....</b>	<b>12</b>
<b>5 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>15</b>
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>20</b>
<b>LIITTEET .....</b>	<b>21</b>
Liite 1 Analyyseissä tarvittavien liuosten valmistusohjeet sekä gram + -värjäyksen toteutus .....	21
Liite 2 Kaikki <i>E.coli</i> -suspensioille PMEU-laitteella saadut tulokset ...	23
Liite 3 Kaikki <i>E.coli</i> -suspensioille lasketut PMEU-tulokset .....	28
Liite 4 Kaikki Petrifilm-kasvatusalustoilla saadut tulokset .....	33

## KUVIOT

KUVIO 1. Kuva PMEU-laitteesta .....	6
KUVIO 2. PMEU-laitteessa käytettävä näyteruisku .....	6
KUVIO 3. Mikroskoopin läpi otettu kuva <i>B.cereus</i> -bakteerista gram- värjäyksen jälkeen .....	9
KUVIO 4. Mikroskoopin läpi otettu kuva <i>E.coli</i> -bakteerista gram- värjäyksen jälkeen .....	10
KUVIO 5. Taulukon 1. arvoilla tehty pesäkeluku – MPN –kuvaaja .....	14

## TAULUKOT

TAULUKKO 1. Viralliset tulokset .....	13
---------------------------------------	----

# 1 OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET

Tämä opinnäytetyö tehtiin Samplion Oy:lle loppuvuodesta 2009 Jyväskylän ammattikorkeakoulun kemian laboratorion tiloissa. Samplion Oy perustettiin vuonna 2009. Sen pääpaikka sijaitsee Siilinjärvellä yrityspuisto INNOCUMissa. Samplion Oy:n tarkoitus on tuotteistaa ja viedä markkinoille mikrobien näytteenottoon, rikastamiseen, diagnostiikkaan ja analytiikkaan kehitettyjä innovatiivisia ratkaisuja sekä uutta teknologiaa, jotka yhdessä muodostavat kokonaisvaltaisen mikrobien määrittämisjärjestelmän. Emoyhtiönsä Finnoflag Oy:n kanssa läheisessä yhteistyössä toimivan Samplion Oy:n laitteiden testaus ja tuotekehitykseen liittyvät mikrobiviljelyt tapahtuvat Finnoflag Oy:n laboratorioissa.

Opinnäytetyön tehtävänä oli validoida putkimenetelmän sovelluksena kehitetty PMEUI-laitteisto (Portable Microbe Enrichment Unit). PMEUI-tulosten validointia varten vertailuna työssä tehtiin rinnalla mikrobiviljelyitä pesäkelukumenetelmällä käyttäen Petrifilm-kasvatusalustaa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkistaa PMEUI-laitteiston toimivuus kvantitatiivisessa mikrobiologisessa määrittämisessä valmista bakteerisuspensiota käyttäen.

## 2 MENETELMÄT JA SOVELLUKSET

### 2.1 MPN-menetelmä

Putkimenetelmää eli MPN-menetelmää (MPN= Most Probable Number) käytetään vesinäytteiden bakteriologisessa tutkimuksessa. Menetelmällä saatu tulos on epätarkka, joten sitä on suositeltavaa käyttää tapauksissa, joissa ei ole mahdollista käyttää tarkempaa menetelmää. Näytteestä tai sen laimennoksesta otetaan yhtä suuret näyte-erät. Tarkoituksena on saada mikrobeja kasvaamaan vain osassa liuosputkista. Mikrobien lukumäärä voidaan laskea vain, jos

osassa putkista tapahtuu positiivinen reaktio ja osassa ei (ks. Liite 2). Määrittäminen perustuu oletukseen, että mikrobit ovat sattumanvaraisesti hajautuneita näytteeseen ja että jokainen solu pystyy yksin panemaan alulle positiivisen reaktion liuosputkessa (SFS 4447, 1).

Putkimenetelmillä arvioidaan mikrobien määrää tapauksissa, joissa pesäke-menelmiä ei voida käyttää. Vaatimuksena on, että mikrobin läsnäolo esim. ravintoliuoksessa voidaan jollakin tavalla todeta. (Niemelä, S. 1979, 41) Tässä opinnäytetyössä mikrobin läsnäolo havainnoitiin silmämääräisesti. Jos liuos oli samea tai siinä ravistelun jälkeen näkyi kasvustoa, tulos oli positiivinen. Kirkas liuos ravistelun jälkeenkin ilmensi negatiivista tulosta. Oikein valitulla laimennossarjalla saadaan osaan putkista kasvua ja osaan ei. Oikein valittu laimennossarja tässä työssä saatiin kokeilemalla. Jos oletetaan Poisson-jakauman säätelevän mikrobien joutumista rinnakkaisnäytteisiin, voidaan steriileinä säilyneiden ja kasvua osoittavien putkien lukumääristä arvioida näytteen todennäköisin mikrobimäärä eli MPN (Most Probable Number). Teoreettisen mallin perustana ovat oletukset, että mikrobit ovat sattumanvaraisesti hajautuneita näytesuspensioon ja että jokainen organismi pystyy yksin panemaan alulle havaittavan kasvun liuosputkessa, minkä lisäksi oletetaan pipetointien tapahtuvan ilman virhettä (Niemelä, S. 1979, 41).

MPN-arvojen (ks. Liite 3) laskemiseen tässä opinnäytetyössä käytettiin Thomas'in likimääräiskaavaa (Niemelä, S. 1979, 46). Mikrobien todennäköisin määrä (MPN) tilavuusyksikköä kohti laskettiin yhtälöllä

$$MPN = \frac{P}{\sqrt{NT}}$$

jossa            P = positiivisten putkien kokonaislukumäärä  
                     T = kaikkien putkien yhteenlaskettu näytetilavuus  
                     N = negatiivisten putkien yhteenlaskettu näytetilavuus

Kaavaa voidaan käyttää yhden tai useammankin putkisarjan tuloksiin. Tässä työssä oli kolme perättäistä laimennosta ja jokaista laimennosta oli viisi rin-

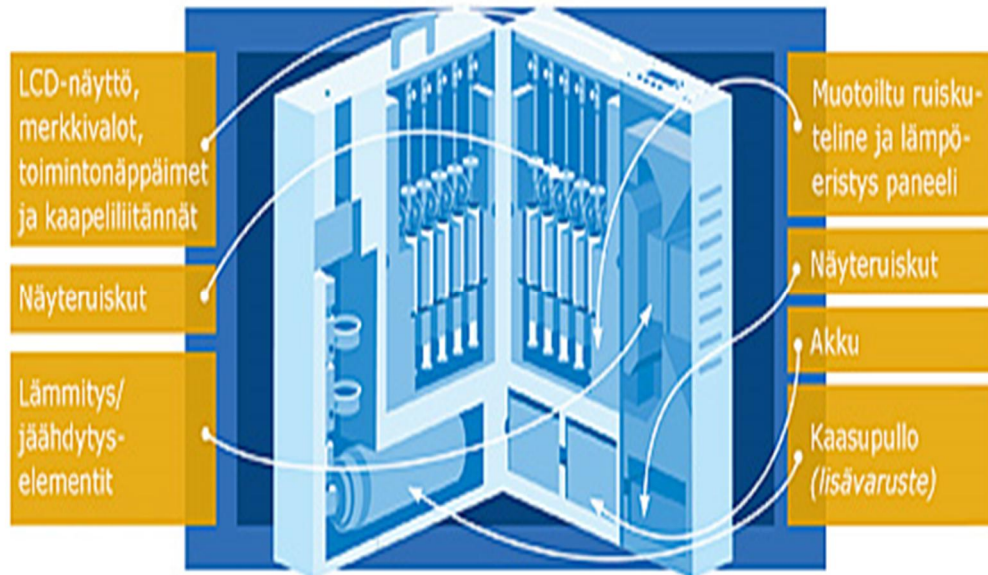
nakkaista putkea. Tulosten laskemiseen voidaan myös käyttää valmiita taulukkoja, mutta tässä opinnäytetyössä tulokset on laskettu itse.

## 2.2 PMEUI-laitteisto

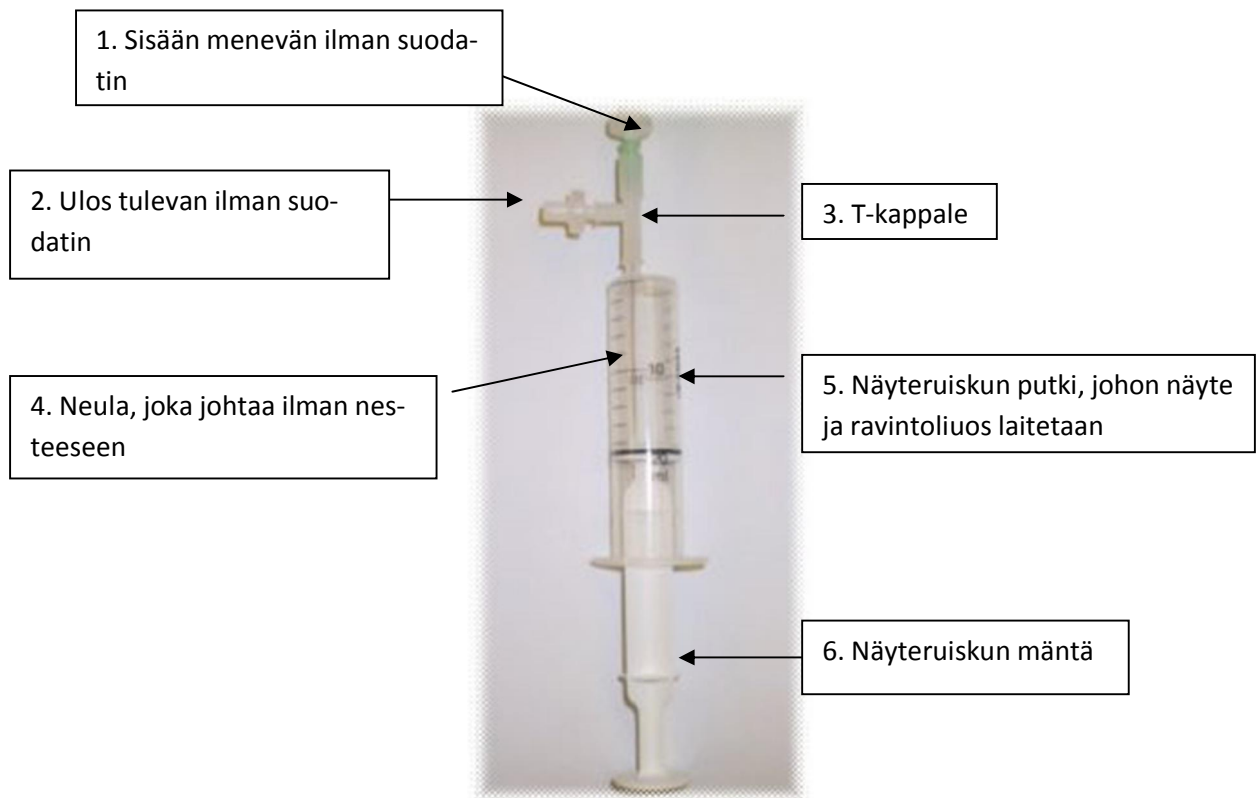
Tässä opinnäytetyössä käytettiin PMEUI-laitetta, joka muunnettiin MPN-menetelmälle sopivaksi. PMEUI (Portable Microbe Enrichment Unit) on kehitetty helpottamaan mikrobiologisia analyysejä. Laitteen käytön etuja ovat mm. liikuteltavuus, helppokäyttöisyys, mikrobille ihanteelliset rikastusolosuhteet, taloudellisuus ja turvallisuus. PMEUI-laitteen sovellusalueita ovat mm. elintarviketeollisuus, turvallisuusala, terveydenhoito ja puunjalostusteollisuus (Edut käyttäjälle).

Laitteen eri osat näkyvät kuviosta 1. PMEUI-laitte on ikään kuin salkku. Ravintoliuos ja näyte laitetaan näyteruiskuihin, jotka kiinnitetään muotoiltuihin ruiskutelineisiin. Näyteruiskut kiinnitetään ilmanjohtoletkuihin, jotka ovat ”salkun” yläosassa sisäpuolella. Ilmanjohtoletkuja pitkin saadaan johdettua haluttua kaasua, yleensä ilmaa, näyteruiskuihin ihanteellisten kasvuolosuhteiden luomiseksi. Ruiskuihin johdetun ilman määrää voidaan säätää vivulla, joka löytyy kunkin ilmanjohtoletkun vierestä. Virtaa laitteeseen saadaan akulla, jos ei verkkovirtaa ole mahdollista saada, kuten esimerkiksi näytteenottopaikalla. ”Salkku” on myös mahdollista kytkeä autossa tupakansytyttimen paikalle, jolloin mikrobien kasvatus voidaan aloittaa heti näytteenoton jälkeen, jos näytteenotto tapahtuu laboratorion ulkopuolella. Kun näyteruiskut ovat paikoillaan ja kaikki osat kiinnitetty toisiinsa, ”salkku” suljetaan, minkä jälkeen LCD-näytöstä voidaan katsoa asetukset ja tarpeen tullen muuttaa niitä toimintonäppäimillä, jotka löytyvät ”salkun” ulkopinnalla. Suurimpana erona kuvion 1 laitteen ja tässä opinnäytetyössä käytetyn laitteen välillä ovat näyteruiskujen määrät. Opinnäytetyössä käytettiin laitteeseen kehitettyjä ilmanjakajaosia, jotka jakoivat ilman toisella puolella kahdessa rivissä oleville näyteruiskuille. Tähän tarkoitukseen tarvittiin myös näyteruiskuteline, johon mahtui yhteensä 10 näyteruiskua. Tässä työssä oli käytössä yhteensä 15 näyteruiskua, jotta saatiin kolmesta perättäisestä laimennostasosta viisi rinnakkaista näytettä kasvamaan yhtäaikaaisesti.





KUVIO 1. Kuva PMEU-laitteesta (Laitteisto)



KUVIO 2. PMEU-laitteessa käytettävä näyteruisku. (Consumables)

Kuviosta 2. näkyvät kaikki näyteruiskuun tarvittavat osat. Näyteruiskun täyttäminen ravintoliuoksella ja näytteellä oli hieman hankalaa. Ensin oli poistettava mäntä (6.) näyteruiskusta (5.) ja tukittava toinen pää tulpalla etteivät ravintoliuos ja näyte pääse valumaan ulos. Kun näyte ja ravintoliuos oli saatu näyte-

ruiskuun, männän takaisin laitto vaati kärsivällisyyttä. Mäntä oli laitettava paikoilleen siten, että se ei työnnä nesteitä sisältään pois. Kun toisessa päässä on tulppa ja toisessa mäntä, mäntää työntäessä paikoilleen sisälle muodostuu painetta, joka pyrkii luonnollisesti ulos. Siksi oli laitettava mäntä varovasti, mutta tiukasti paikoilleen ja sitten poistettava tulppa. Kun mäntä saatiin kunnolla paikoilleen, tulpan tukkimaan suuhun laitettiin ensin kuviossa 2 näkyvä T-kappale (3.), johon voitiin liittää muut osat. Yhteen T-kappaleen haaraan laitettiin ainoastaan suodatin (2.), joka suodattaa näyteruiskusta poistuvan ilman. Toiseen haaraan laitettiin ensin neula (4.), jonka läpi ilma pääsee näyteruiskuun. Neulan suulle lisättiin vielä suodatin (1.) suodattamaan näyteruiskuun tulevaa ilmaa. Sitten näyteruiskun sisään menevän ilman suodatin kiinnitettiin ilmaa johtavaan letkuun, joka sitten oli kiinni laitteessa.

## 2.3 Pesäkelukumenetelmä

Pesäkelukumenetelmässä näytteen laimennosta pipetoidaan kasvualustalle, tässä työssä Petrifilm’lle. Inkuboinnin jälkeen lasketaan pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) lukumäärä millilitraa (ml) kohti näytettä kasvualustalle muodostuneiden pesäkkeiden lukumäärästä (SFS-EN ISO 6222, 4) (ks. Liite 4). Analyyseissä käytettiin useita näytteen laimennostasoja, jotta löydetäisiin niiden joukosta kvantitatiiviseen määrittelyyn sopivat, n. 30 ... 100 PMY/ml sisältävät tasot. Pesäkelukumenetelmä ei kerro mitä alustalla kasvaa, mutta puhtaasta viljelmästä, kuten tässä opinnäytetyössä, asiasta ei ole epäilystä.

## 2.4 Petrifilm-kasvatusalusta

Petrifilm (3M, U.S.A.) on kasvatusalusta, joka on suunniteltu tehostamaan ja helpottamaan mikrobiologisia määrittelyksiä. Petrifilm-kasvatusalustan hyödyt muihin kasvatusalustoihin nähden ovat mm.

- helppous; ei maljojen valamista,

- nopeakäyttöisyys; säästää aikaa joka muutoin kuluisi kasvatusalustojen tekemiseen sekä
- pieni tilantarve; säästää tilaa varastossa, lämpökaapissa ja autoklaavissa, eikä jätettäkään synny niin paljoa kuin tavallisten maljojen kanssa. (Mikrobiologinen viljely)

## 2.5 ATP-määritys

Kaikkien elävien solujen energialähde on ATP (adenosiinitrifosfaatti). ATP:n määrä kaikissa bakteerisoluihin on sama. ATP:n määrä kuvaa solun tilavuutta. Bakteerisoluille tämä luku on 1 - 2 attomoolia ( $10^{-18}$ ). Jos jokin häiritsee solun energia-aineenvaihtoa, ATP-taso putoaa ja solu todennäköisesti kuolee sekunneissa. ATP:n kokonaismäärästä voidaan päätellä solujen kokonaismäärä näytteessä. Jos tiedetään ATP:n määrä solussa, voidaan laskea solujen määrä millilitrassa. (Rapid microbiology)

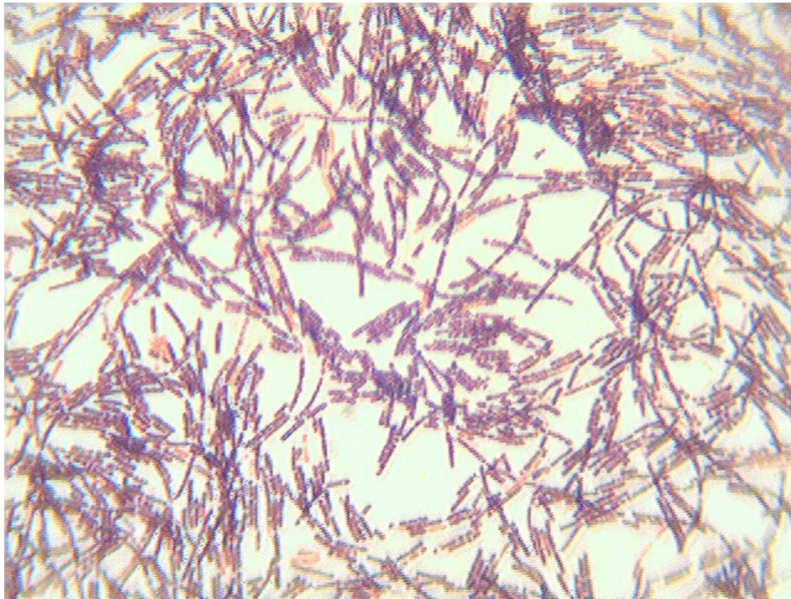
Tässä työssä ATP-määrityksessä käytettiin ATP Biomass Kit HS:ään (BIOT-HEMA, Ruotsi) kuuluvia reagensseja. ATP-määritystä käytettiin opinnäytetyössä vain suuntaa antavana apuna. Määrityksessä saatujen tulosten perusteella pääteltiin sopivat laimennokset käytettävälle bakteerisuspensioille.

## 3 KÄYTÄNNÖN SUORITUS

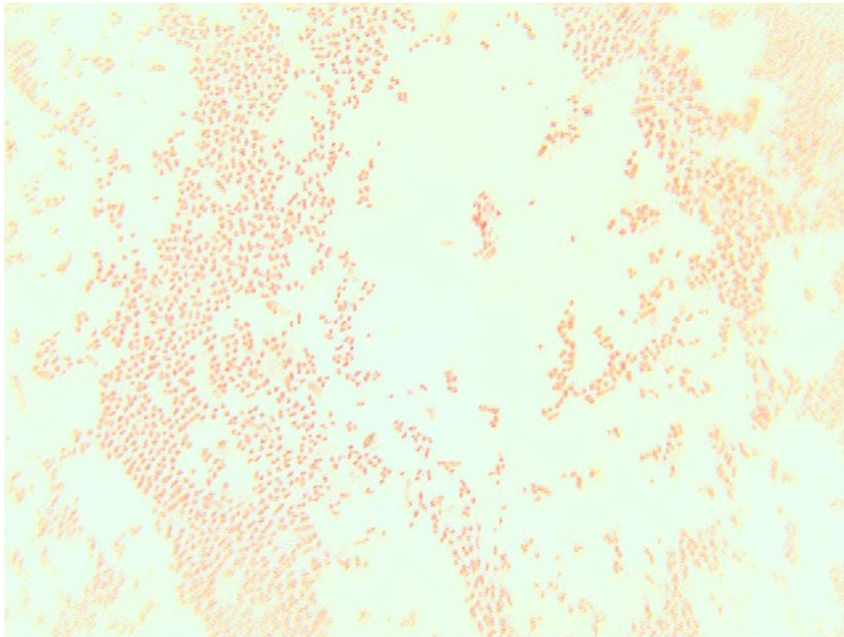
### 3.1 Viljelmien käyttöönotto

Ensimmäisenä työssä varmistettiin bakteeriviljelmien puhtaus. Lähtökohtana oli kaksi eri bakteeriviljelmää, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ja *Escherichia coli* (*E. coli*). Näistä viljelmistä otettiin pesäkkeet ja siirrostettiin ne silmukalla kahdelle rinnakkaismaljalle. Yhdet rinnakkaiset jätettiin kasvamaan huoneenlämpöön ja toiset laitettiin jääkaappiin odottamaan varmuuden vuoksi.

Huoneenlämmössä kasvaneiden viljelmien puhtaus tarkistettiin suorittamalla gram-värjäys (ks. Liite 1) ja mikroskoopilla tarkastelemalla. Kuviosta 3 nähdään puhdas *B.cereus*-kasvusto sauvamaisina violetilla värillä. Punaisella näkyvät kohdat ovat vanhoja bakteereja ja siksi ne ovat päästäneet värin pois. Kuviosta 4 näkyy puhdas *E.coli*-kasvusto punaisina palloina.



KUVIO 3. Mikroskoopin läpi otettu kuva *B.cereus*-bakteerista gram-värjäyksen jälkeen (puhdas). Violetit solut ovat uusia ja punaisena näkyvät solut ovat vanhoja ja siksi päästivät värin pois alkoholi-pesussa.



KUVIO 4. Mikroskoopin läpi otettu kuva *E.coli*-bakteerista gram-värjäyksen jälkeen (puhdas)

### 3.2 ATP-MÄÄRITYS

ATP-määrityksessä näytettä mitattiin kyvetiin 100  $\mu$ l, minkä jälkeen kyvetiin lisättiin 100  $\mu$ l solut särkevää Extractant B/S -liuosta. Kyvetiin lisättiin vielä 500  $\mu$ l ATP reagent HS -liuosta, minkä jälkeen kyvetiä sekoitettiin varovasti. Kyveti asetettiin luminometriin ja mittaus suoritettiin välittömästi. Mittaus oli suoritettava välittömästi, koska entsyymireaktio heikkenee ajan kuluessa. Tuloksesta voitiin päätellä, kuinka paljon näytettä tulisi laimentaa, jotta saataisiin laskettavissa olevia tuloksia.

### 3.3 Laimennosten valmistus

Työn aloitusta varten valmistettiin THG-liuosta (tryptoni-hiivauute-glukoosi) (ks. Liite 1) putkimenetelmän kasvatusliuokseksi sekä 0,9- prosenttista NaCl-liuosta (natriumkloridi) (ks. Liite 1) bakteerisuspensioiden laimennusta varten.

Jotta saataisiin käsitys, millaisia laimennoksia tulisi käyttää, suspensiolle tehtiin ATP-määritys käyttäen BioTheman ATP Biomass Kit HS -kittiä.

ATP-määrityksen jälkeen alettiin tehdä bakteerisuspensioista laimennoksia. Alkuperäistä näytettä laimennettiin ensin koeputkissa 0,9- prosenttisella NaCl-liuoksella. Laitteeseen mahtui viisi rinnakkaista näytettä jokaisesta laimennoksesta, joita tehtiin kolme perättäistä tasoa. Perättäisiä laimennoksia käytettiin, kuten Petrifilm-menetelmässäkin, oikean laimennostason ”haarukointiin”, joskin käytettiin menetelmän herkkyyden vuoksi pidemmälle vietyjä laimennoksia.

#### 3.3.1 Putkimenetelmä

Työ aloitettiin *E. coli*n kasvatuksella PMEU-laitteella. Kun kasvatus oli saatu muutaman kerran onnistumaan ja tuloksia saatu, vaihdettiin bakteeri *B. cereus* -kseen. Varsinainen validointi päätettiin kuitenkin tehdä ainoastaan *E. coli*-suspensioilla, koska *B. cereus* -analyysit olisivat laajentaneet työtä kohtuuttomasti mm. itiöinnin ja itiöiden germinaation hallintaan vaadittavien toimenpiteiden vuoksi.

Näyteruiskuihin laitettiin 15 ml THG -ravintoliuosta, jonka jälkeen lisättiin 1 ml bakteerisuspensiota. Kun kaikki laimennokset oli käsitelty samoin ja näyteruiskut laitettu paikoilleen, ”salkku” suljettiin ja asetusten (35 °C ja 80 % ilmastus) tarkistuksen jälkeen kone käynnistettiin ja jätettiin käyntiin 24 tunnin ajaksi, minkä jälkeen tulokset tulkittiin ja kirjattiin ylös.

Työn alussa samoja laimennoksia käytettiin sekä näyteruiskuihin että kasvatusalustoille. Työn edetessä kasvatusalustoille laitettiin laimeampia näytteitä

kuin näyteruiskuihin, koska putkimenetelmä on herkempi ja siksi vaatii suurempia laimennoksia.

### **3.3.2 Pesäkelukumenetelmä**

Petrifilm-alustan käsittely oli nopeampaa. Jokaista laimennosta varten oli yksi filmi. Viileässä säilytettävät filmit eivät vaatineet esikäsittelyä. Valittua laimennosta pipetoitiin 1 ml filmille, minkä jälkeen filmissä oleva suojakalvo laskettiin näytteen päälle ja näytettä painettiin pyöreällä muotilla, jotta kasvu saatiin rajattua tietylle alueelle. Tämän jälkeen filmit laitettiin lämpökaappiin 37 °C:seen kasvamaan. Noin puolessa välissä käytännön osuutta myös filmit laitettiin PMEU-laitteen sisällä olevaan koloon kasvamaan, jotta kasvuolosuhteet olisivat samanlaiset näyteruiskuille ja Petrifilm-kasvatusalustoille.

## **4 TULOKSET**

MPN- menetelmän tarkoituksena oli saada sekä positiivisia että negatiivisia tuloksia putkissa olevan kasvuston suhteen. Jos putkessa oleva liuos oli samea tai siinä ravistelun jälkeen ilmeni sameutta, tulos oli positiivinen. Jos sameutta ei ilmennyt ravistelunkaan jälkeen, tulos oli negatiivinen. (ks. Liite 2)

Pesäkelukumenetelmällä oli tarkoitus saada kasvua siten, että pesäkkeiden lukumäärä pystyttäisiin laskemaan ja niiden määrä oli n. 30 – 100 kpl. (ks. Liite 4)

TAULUKKO 1. Viralliset tulokset.

Päivämäärä	Pesäke (PMY/ml)	MPN (PMY/ml)
8.10.	2,9E+09	4,3E+11
18.11.	2,4E+08	4,1E+13
19.11.	1,5E+08	6,8E+13
2.12.	6,5E+08	1,7E+14
4.12.	3,8E+08	3,5E+18
7.12.	4,4E+07	6,3E+17
10.12.	1,6E+08	5,5E+17
16.12.	1,5E+08	1,5E+18
17.12.	8,3E+08	5,7E+18

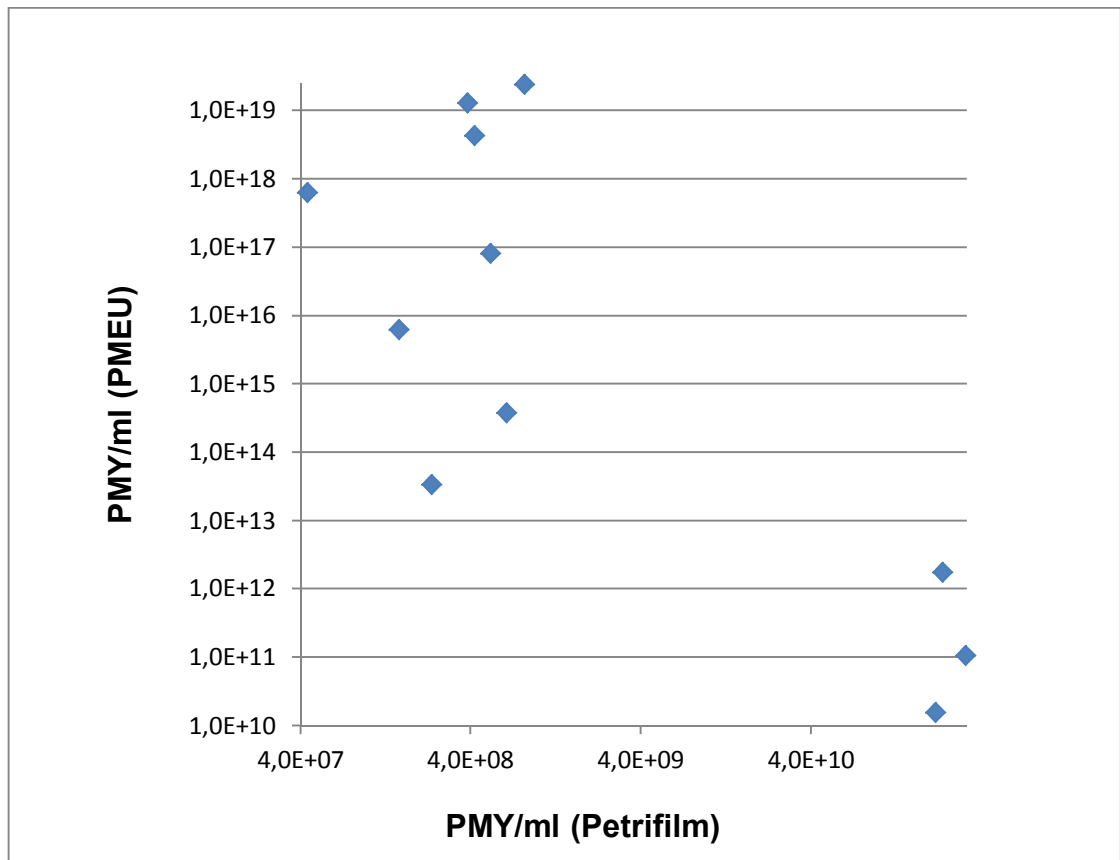
Taulukossa 1. olevat tulokset ovat valittu siten, että kyseisenä päivänä on saatu molemmilla menetelmillä tulos. Näin on voitu laskea molempien menetelmien mukaan alkuperäisen näytteen mikrobimäärä, mikä oli tavoitteena näissä analyyseissä. Kaikkia PMEÜ-tuloksia (ks. Liite 2) ei voitu käyttää, koska osaan ei saatu lainkaan negatiivisia tuloksia. Vaikka monista PMEÜ-analyyseistä saatiin laskettua tulos (ks. Liite 3), ei niitä voitu käyttää, koska Petrifilm-kasvatusalustalla ei saatu vertailutulosta (ks. Liite 4).

Taulukossa 1. olevan pesäke-sarakkeen tulokset laskettiin pesäkkeiden lukumäärästä ja laimennuskertoimesta, josta saadaan alkuperäisessä liuoksessa olevien mikrobien arvioitu määrä. MPN-sarakkeen tulokset laskettiin käyttäen Thomas'in likimääräiskaavaa (ks. s.3). MPN-luvun laskemiseen käytettiin vain yhden laimennostason positiivisten näyteputkien määrää ja negatiivisten putkien sisältämien alkuperäisnäytteen määrät.

Laskettujen tulosten pitäisi olla suurin piirtein samaa tasoa, koska mittaukset tehtiin aina saman näytteen eri laimennoksista ja tarkoituksena oli laskea aina alkuperäisen näytteen sisältämä bakteerimäärä.

Tuntemattomasta syystä molempien menetelmien laimennostasoja jouduttiin työn edetessä suurentamaan, jotta saatiin laskettavia tuloksia. PMEÜ-laitteen herkkyyden takia sen laimennostasoja jouduttiin viemään pidemmälle kuin pesäkelukumenetelmässä.





KUVIO 5. Taulukon 1. arvoilla tehty pesäkeluku – MPN –kuvaaja.

Kuviossa 5. olevan kuvaajan pitäisi olla jokseenkin lineaarinen. Tässä työssä monien tekijöiden summana kuvaajasta ei tullut selkeästi lineaarista vaan pisteet asettuivat selvästi kahteen ryhmään. Oikeassa alareunassa olevat pisteet ovat ns. luotettavalla alueella. Nämä pisteet kuvaavat sitä, kuinka PMEU-laitteella ja Petrifilm-kasvualustalla pystytään saamaan samalla alueella olevia tuloksia. Oikean alalaidan pisteryhmästä voidaan päätellä, että MPN-menetelmä toimii PMEUIlla.

Ylälaidassa olevaa pisteryhmää ei periaatteessa pitäisi olla olemassakaan.

Näin korkeita tuloksia on periaatteessa mahdotonta saada MPN-menetelmällä. Tälle ylemmälle pisteryhmälle voi olla useampikin selitys, mutta varmaa vastausta ei nyt pystytä todistamaan.

Koska arvopisteet ovat sijoittuneet kuten kuviossa 5, ei korrelaatiokerrointa ole järkevää laskea. Koska luotettavalla alueella olevat pisteet ovat oikean alalaidan kolme pistettä, niille ei kannata laskea korrelaatiokerrointa.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida MPN-menetelmän sovelluksena kehitetty PMEU-laitteisto. PMEU-tulosten vertailua varten työssä tehtiin rinnalla mikrobiviljelyä pesäkelukumenetelmällä käyttäen Petrifilm-kasvatusalustaa. Työn tarkoituksena oli tarkistaa PMEU-laitteiston toimivuus kvantitatiivisessa mikrobiologisessa määrittäyksessä valmista bakteerisuspensiota käyttäen.

Tulokset eivät olleet odotettuja. Silti tämä opinnäytetyön tekeminen ei ollut turhaa. Tarkoituksena oli tarkistaa PMEU-laitteiston toimivuutta kvantitatiivisessa mikrobiologisessa määrittäyksessä. Menetelmä ei ole varma, mutta tuloksia saatiin, joten voidaan päätellä laitteen toimivan.

Työn mahdollisia virhelähteitä on useita. Inhimilliset pipetointivirheet saattoivat vaikuttaa tulosten epätasaisuuteen. Myös näyteliuosten epätasaisuus ja pituus vaikuttivat osaltaan lopputuloksiin.

Kokemattomuuteni PMEU-laitteen kanssa oli myös mahdollinen virhelähde. Bakteerien ilmastus oli välillä liian kovalla, josta seurasi se, että välillä putkissa oleva neste oli vähentynyt liikaa. Liiallinen ilmastus myös kontaminoi suodattimia, kun neste pääsi nousemaan niihin asti.

Testien puolivälissä koneessa ilmeni virtahäiriöitä ja laite oli sammunut yön kasvatuksen aikana. Tämä ei kuitenkaan ole kovin todennäköinen virhelähde, koska silloin kasvatuksessa ollut *B. cereus* oli kuitenkin kasvanut. Ongelma korjautui uudella virtalähteellä.

*B. cereuksen* kasvatuksen jälkeen putkissa ja neulaosissa näkyi kasvua vaikka ne olivat käyneet läpi autoklavoinnin. Tämän takia jatkossa ennen autoklaaviin menoa kaikki osat (poislukien suodattimet) pestiin astianpesuaineella ja huuhdeltiin alkoholilla.

Uusia, steriilejä osia myös otettiin käyttöön, aina kun niitä oli mahdollista saada. Mutta siltikin työn loppuosan tulokset ovat jostain syystä paljon korkeampia kuin alkupään. Mikrobiviljelyn nuorennus olisi voinut olla tässä vaiheessa aiheellista tehdä, mutta se jäi tekemättä, koska etsin mahdollista kontaminaation syytä muualta.

Kaikkien varotoimenpiteiden jälkeen kontaminaation mahdollisuus on loppujen lopuksi pieni, mutta mahdollinen. Jos kuitenkin suljemme pois kontaminaation mahdollisuuden, yksi syy tulosten heittelyyn voisi olla itse *E.coli*-bakteerin muuntuminen. Koska testeissä siirrostettiin aina edellisen testin kantaa uuteen testiin, on todennäköisesti tapahtunut selektiota.

Vaughn S. Cooper ja kumppanit (Cooper, V. 2001, 891) huomasivat testeissään, että *E.coli*n kasvunopeus vaihtelee eri lämpötiloissa, jos samaa bakteerikantaa käytetään populaatiosta toiseen. Tässä työssä käytettiin 35 °C:n lämpötilaa, joten on mahdollista, että *E.coli*-kannan kasvunopeus kohosi analyysin edetessä ja siksi PMEU-laite antoi suurempia tuloksia kuin Petrifilm-kasvatusalusta. Tästä johtui erheellinen oletus kontaminaatiosta.

MPN-tulokset luettiin aina suunnilleen saman kasvatusajan jälkeen. MPN-menetelmä on herkkä lukuajan suhteen, joten tulokset pyrittiin lukemaan aina 24 tunnin kasvatuksen jälkeen. Jos *E.coli*n kasvunopeus oli kohonnut, se johti ajan mittaan kasvaneiden putkien määrän kasvuun ja mikrobien lukumäärän tason nousuun. Koska MPN-analyysi on nopeampi, se on paljon herkempi kasvunopeuden muutokselle kuin Petrifilm-analyysi. (Mentu, J.13.5.2011)

*E.coli*-bakteeri saattaa muodostaa kasvaessaan limaa, minkä takia on voinut muodostua soluryppäitä, joista soluja ei saa irtoamaan edes kunnon sekoituksellakaan ja siitä johtuu *E.coli*-kannan kummallinen käyttäytyminen (Mentu, J. 13.5.2011). Jos tällaisia ryppäitä on ollut valmistamissani suspensioissa, se voisi selittää taulukossa 1 (s.12) näkyvät suuret MPN-arvot ja kuviossa 5 (s.13) olevan ylemmän pisteryhmän sekä myös sen, miksi Petrifilm-kasvatusalustoilla kasvun määrä väheni. Jos alkuperäisessä näytteessä olevat bakteerit ovat liman muodostumisen takia suurina ryppäinä, niiden ”osuminen” laimennokseen harvenee. Pesäkelukumenetelmällä lasketaan vain kasvualustalle muodostuneet pisteet eli pesäkkeet. Yleensä oletetaan yhden solun aina muodostaneen yhden pesäkkeen, koska niin se yleensä käytännössä on. Mutta tässä opinnäytetyössä saaduista tuloksista ei voida sanoa, onko pesäkkeen muodostanut vain yksi solu vai yksi solurypäs, milloin bakteerimäärä olisi todellisuudessa laskettua tulosta suurempi.

PMEU-laitteelle tehtyihin laimennoksiin pätee sama mahdollinen liman muodostumisesta seuraavien soluryppäiden tuottama ongelma. Todennäköisyys

positiiviseen tulokseen on pienempi jos solut ovat ryppäinä kuin jos kaikki solut olisivat irrallaan. Tuloksista päätellen liman muodostusta on tapahtunut opinnäytetyötä tehdessä ja se on todennäköisin syy saatuihin, erikoisiin tuloksiin.

Analyysejä tehtäessä käsiteltiin kahta eri bakteeria ja nämä kaksi kantaa saattoivat päästä kosketuksiin toistensa kanssa ja muodostaa sekapopulaation. Koska kantoja ei tarkistettu enää työn aloituksen jälkeen, varmaa vastausta tähän ei ole mahdollista saada. Mutta, jos näin pääsi käymään, se olisi yksi selitys saaduille tuloksille. *E.coli*- ja *B.cereus*- bakteerikantojen sekapopulaatioiden synergia kasvattaisi positiivisten reaktioiden määrää (Madsen, E. 2008, 349) putkissa ja siksi tulokset voisivat olla tällaiset, kuin tässä opinnäytetyössä saadut. On mahdollista, että osa putkista, joissa kasvu oli rihmamaista, olikin *B.cereus*-bakteerin itiöiden aikaansaama väärä positiivinen tulos. Saatujen korkeiden bakteerimäärien voisi olettaa johtuvan tästä synergiasta ja *E.coli*-bakteerin limanmuodostuksesta. Tällöin soluryppäässä olisi todennäköisesti molempia bakteereja ja on melko todennäköistä, että aina jompikumpi tai sitten molemmat muodostaisivat kasvustoa näyteruiskuun ja saataisiin positiivinen tulos.

*E.coli*-kasvuston käsittely tuo oman lisänsä kannan stressitekijöihin. Tällaisia tekijöitä ovat mm. siirrostus huoneenlämpöiseltä agar-maljalta laimennosveetien ja näin ollen uuteen kasvuympäristöön ja – lämpötilaan. Stressitekijät iskevät voimakkaammin kiinteän alustan kasvatukseen kuin liemiviljelmiin. Sopeutuminen kasvatuksesta toiseen ilmenee voimakkaammin PMEU:ssa eikä välttämättä näy samalla tavoin Petrifilm:llä, koska sopeutumista ei tapahdu kasvatusalustalla vaan PMEU-liemessä. (Mentu, J. 6.5.2011)

### **Mitä olisi voinut tehdä toisin?**

Opinnäytetyössä oli tarkoitus validoida monipaikkaisen minifermentorin käyttö mikrobiologisiin määrittelyihin. Tulosten vertailuun käytettiin rinnalla mikrobiviljelystä pesäkelukumenetelmää, jossa käytettiin Petrifilm-kasvatusalustaa.

Ensimmäiseksi olisi pitänyt tehdä jonkinlainen toimintasuunnitelma tulevia määrittelyjä varten. Koska opinnäytetyö tehtiin ilman minkäänlaista varsinaista kirjallista suunnitelmaa, oli analyysien tekeminen hetkessä elämistä.

Perehdytykseni PMEU-laitteeseen olisi voinut olla hieman perusteellisempaa. Käyttöohjeet esimerkiksi olisi ollut hyvä olla käytössä. Tulevaisuuden varalle olisi hyvä kehittää käyttöohje, koska selkeä käyttöohje säästää aikaa ja vähentää virheiden syntymistä ennakolta.

Koska työn tuloksia tarkastellessa huomattiin poikkeavuudet tuloksissa, olisi ollut hyvä tutkia tuloksia tarkemmin jo aiemmin. Silloin olisi voitu tutkia, miksi tulokset olivat sellaisia kuin ne olivat. Bakterikantojen puhtauden tarkistus olisi pitänyt tehdä useampaan kertaan eikä vain ennen työn aloitusta. Näin olisi voitu aiemmin huomata, jos kontaminaatiota oli tapahtunut.

Pesäkelukumenetelmässä käytetyille Petrifilm-analyysille olisi voitu tehdä rinnakkaiset näytteet, jotta tulokset olisivat olleet luotettavampia. Vaikka pesäkelukumenetelmä onkin luotettavampi ja tarkempi kuin putkimenetelmä, rinnakkaisilla näytteillä olisi voitu ongelmatilanteissa mahdollisesti tutkia tuloksia tarkemmin. Ongelmatilanteissa olisi myös voitu paremmin tutkia sitä, mistä kasvun puuttuminen kasvatusalustoilla saattoi johtua. Jos liman muodostuminen olisi otettu aiemmin huomioon, olisi voitu kasvaneita pesäkkeitä tutkia tarkemmin. Olisi voitu pyrkiä tarkistamaan, onko pesäkkeen muodostanut vain yksi solu, vai oliko pesäkkeen muodostumiseen ollut vaikuttamassa useamman solu rypäs.

Jotta PMEU-tulokset olisivat luotettavammat, olisi pitänyt aiemmin ottaa huomioon *E.coli*-kannan mahdollinen liman muodostus. Tällöin väärin positiivisten tulosten määrä olisi pienempi. Kun positiivisiksi laskettiin kaikki putket, joissa näkyi jonkinlaista kasvustoa, eivät kaikki tulokset ole välttämättä täysin luotettavia. Osassa positiivisiksi tuloksiksi huomioiduissa putkissa kasvusto oli rihmamaista, joka ei välttämättä ollut kuitenkaan *E.coli*-bakteerin muodostamaa. Kun *E.coli*-bakteeri kasvaa, se samentaa koko liuoksen eikä positiivisesta tuloksesta ole epäilystä (Mentu J. 13.5.2011).

Koska menetelmää oli tarkoitus testata opinnäytetyössäni, voin esittää muutamia parannusehdotuksen tulevia analyyskejä ja testejä varten. Vaikka sainkin paljon vaihto-osia, kuten esimerkiksi näyteruiskuja, niiden kierrättäminen pitkään ei onnistu. Olisi hyvä testata, kuinka monta kertaa yhdellä ainoalla bakteerilla samoja näyteruiskuja voidaan kierrättää. Koska työssäni oli käytössä periaatteessa koko ajan samat näyteruiskut, *B.cereus*-bakteerin itiöt mah-

dollisesti selvisivät autoklavoinnista ja siksi saattoivat aiheuttaa kontaminaation. Käytössäni oli yhteensä 45 näyteruiskua, joten niitä oli mahdollista aina kierrättää. Analyysejä tein 30, joten käyttökertoja tuli 450. Näistä luvuista laskettuna jokaista näyteruiskua käytettiin suunnilleen 10 kertaa. Näin monen kerran kierrätys on todennäköisesti liian paljon. Tosin, yhden ainoa bakteerikannan analysoinnissa se voisi onnistua, koska mitään käytännönvikaa en näyteruiskuihin huomannut.

Näyteruiskujen sisällä olevaa neulaa suosittelisin vaihtamaan myös useammin, jos käytössä on useampia bakteerikantoja. Koska neula on ohut, sen sisäosan puhtauden varmistus on hieman hankalaa. Jos neuloja ei vaihdeta usein, olisi jotenkin varmistettava, että neulan sisäosa tulee varmasti puhtaaksi kaikesta mahdollisesta, mitä bakteeri voi ns. jättää jälkeensä.

Suodattimista sanoisin sen verran, että aina tulisi varmistaa ainakin näyteruiskun menevää ilmaa suodattavan suodattimen puhtaus. Suodatin tulisi vaihtaa vielä useammin kuin muut, koska jos näyteruiskun sisäilman suodatin on kontaminoitunut, se melko varmasti kontaminoi myös näytteen. Ulos tulevan ilman suodattimen kierrätys voisi olla pidempikin kuin sisään menevän ilman. Mutta ulos menevän ilman suodattimenkin puhtaudesta on pidettävä huolta, ettei kontaminaatiota pääse tapahtumaan. Koska suodattimia oli käytössäni kahta eri kokoa, suosittelisin tulevaisuudessa käyttämään pienempiä sisään menevän ilman suodatukseen ja isompia poistuvan ilman suodattamiseen. Näin ollen kontaminaatoriski saataisiin mahdollisimman pieneksi, kun suodattimet eivät mene sekaisin.

## LÄHTEET

Consumables. n.d. Näyteruiskun kuva Finnoflag Oy:n sivustolla. Viitattu 23.5.2011. <http://www.finnoflag.com/consumables.htm>

Cooper, V.S., Bennet, A.F., Lenski, R.E. 2001. Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20 000 generations in a constant environment. Viitattu 23.5.2011.  
<http://compphys.bio.uci.edu/bennett/pubs/146.pdf>

Edut käyttäjälle. n.d. PMEÜ-järjestelmän edut käyttäjälle. Viitattu 23.5.2011.  
<http://www.samplion.fi/fi/> Viitattu 11.5.2011

Laitteisto. n.d. PMEÜ-laitteiston tekninen esittely. Viitattu 23.5.2011.  
<http://www.samplion.fi/fi/laitteisto/>

Madsen, Eugene L. 2008. Environmental Microbiology. Blackwell publishing, Massachusetts, U.S.A.

Mentu, J. 2011. Re: Vs: Re: Oppari. Sähköpostiviesti 13.5.2011. Vastaanottaja V. Hakonen. Selvennystä teoriaan.

Mentu, J. 2011. MPN-tulosten ajallinen trendi ja sen syyt?. Sähköpostiviesti 6.5.2011. Vastaanottaja V.Hakonen. Saatujen MPN-tulosten mahdollisia syitä.

Mikrobiologinen viljely. n.d. Pdf-tiedosto Labema Oy:n sivustolla. Viitattu 23.5.2011 <http://www.labema.fi/netta/files/100-28.pdf>

Niemelä, Seppo. 1979. Mikrobiologisen havaintoaineiston tilastollisen käsittelyn alkeet. Helsingin yliopiston mikrobiologian laitoksen julkaisuja 17.

Rapid microbiology. n.d. Ohjeistus ATP:n mittauksesta. Viitattu 23.5.2011  
<http://www.mamut.net/biothema/subdet8.htm>

SFS 4447. 1979. Putkimenetelmä veden mikrobiologisessa tutkimuksessa. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS. Viitattu 23.5.2011.

SFS 6222. 1999. Veden laatu. Viljeltävien mikro-organismien lukumäärän laskeminen. Pesäkelasku siirrostamalla agar-ravintoalustaan. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS. Viitattu 23.5.2011.

## LIITTEET

### Liite 1. Analyyseissä tarvittavien liuosten valmistusohjeet sekä gram+ - värjäyksen toteutus.

#### Tryptoni-hiivauute-glukoosi-ravintoliuoksen valmistus

Tarvittavat määrät:

	(per litraa liuosta)	(per 450 ml liuosta)
tryptoni	5,0 g	2,250 g
hiivauute	2,5 g	1,125 g
glukoosi	1,0 g	0,450 g

Punnitut määrät lisättiin tislattuun veteen, jonka jälkeen seosta lämmitettiin kunnes kuiva-aineet olivat lienneet. Tämän jälkeen seokset laitettiin autoklaaviin asetuksilla 20 minuuttia ja 120°C.

Ravintoliuoksen kontaminaatioriskin vähentämiseksi liuosta tehtiin 450 ml autoklaavipulloihin 1 l pullojen sijaan.

#### 0,9- prosenttisen NaCl-liuoksen valmistus

Tehtiin 450 ml liuosta, joten NaCl:a tarvittiin  $10 \text{ g/l} \cdot 0,45 \text{ l} = 4,5 \text{ g}$ .

NaCl liuotettiin tislattuun veteen ja laitettiin autoklaaviin asetuksilla 20 minuuttia ja 120°C.

#### Gram + - värjäys

Viljelystä otettiin näyte lasialustalle ja kiinnitettiin se lämmittämällä sitä hieman keittolevyn päällä. Näyte värjättiin kristallivioletilla ja minuutin odotuksen jäl-



keen se pestiin pois vedellä. Seuraavaksi näyte värjättiin jodilla ja minuutin odottelun jälkeen jodi pestiin pois ensin vedellä ja sitten etanolilla. Lopuksi värjättiin vielä safraniinilla, joka pestiin pois vedellä.

## Liite 2. Kaikki *E.coli*-suspensioille PMEU-laitteella saadut tulokset

Taulukoissa (+) kuvaa positiivista tulosta (kasvua) kyseisessä putkessa ja (-) negatiivista tulosta (ei kasvua). Laimennus-sarake kuvaa käytettyä laimennostasoa. 1., 2., jne. kuvaavat rinnakkaisnäytteitä. o-merkit osoittavat laimennoksen, jonka mukaan MPN-arvo on laskettu. o-merkki ja pystyviiva kuvaavat virallisiin tuloksiin mukaan otettuja laimennoksia. Kaikkia tuloksia ei voitu käyttää, koska pesäkelukumenetelmällä ei saatu aina tulosta, johon verrata saatua MPN-tulosta.

29.9.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
III	+	+	+	+	+
IV	+	+	+	+	+
V	+	+	+	+	+

30.9.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
III	+	+	+	+	+
IV	+	+	+	+	+
V	+	+	+	+	+

5.10.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
II	+	+	+	+	+
III	+	+	+	+	+
IV	+	+	+	+	+

6.10.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
VI	-	-	+	+	-
VII	+	+	-	+	-
VIII	-	-	+	-	-

7.10.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
VII	+	-	-	-	-
VIII	+	-	-	-	+
IX	+	+	+	+	+

o

8.10.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
VIII	-	-	-	-	-
IX	+	+	-	-	+
X	-	-	-	+	+

o

|

16.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
VIII	+	+	-	-	+
IX	+	+	-	-	-
X	+	+	+	+	+

o

17.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
VIII	+	+	+	+	-
IX	+	+	+	+	+
X	+	+	+	+	+

o

18.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
IX	+	+	-	-	-
X	-	-	+	+	+
XI	+	-	+	+	+

o

|

19.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
IX	+	+	-	+	+
X	+	-	+	+	-
XI	+	+	+	-	-

o

23.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XI	+	+	-	-	+
XII	+	+	-	+	+
XIII	+	-	+	+	+

o

25.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XII	+	+	-	-	+
XIII	-	+	-	+	+
XIV	+	+	-	+	-

o

27.11.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XIII	-	-	+	+	+
XIV	+	+	+	+	-
XV	-	-	-	-	+

o

1.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XIII	-	-	-	-	-
XIV	+	-	-	-	-
XV	-	+	-	-	-

o

2.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
X	-	+	+	+	+
XI	-	-	-	+	-
XII	+	+	+	-	+

o

|

4.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XIII	+	-	+	+	+
XIV	-	-	+	+	+
XV	-	-	-	-	-

o

|

7.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XIII	-	-	-	-	-
XIV	-	+	-	+	-
XV	-	-	-	-	+

o

|

8.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XII	-	+	+	+	+
XIII	-	+	+	+	+
XIV	+	+	+	+	+

o

10.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XII	-	+	+	+	+
XIII	-	+	+	+	+
XIV	-	+	+	-	+

o

|

16.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XII	+	+	+	+	+
XIII	+	+	+	+	+
XIV	+	+	+	-	+

o

|

17.12.2009					
Laimennus	1.	2.	3.	4.	5.
XIII	+	+	+	+	+
XIV	-	+	+	+	+
XV	-	+	+	-	+

o

|

### Liite 3. Kaikki *E.coli*-suspensioille lasketut PMEÜ-tulokset

Taulukoissa MPN kuvaa saaduista mittaustuloksista laskettua arvoa, P kuvaa positiivisten putkien kokonaislukumäärää (kpl), T kuvaa kaikkien putkien yhteenlaskettua näytetilavuutta (ml), N kuvaa negatiivisten putkien yhteenlaskettua näytetilavuutta (ml) ja roomalaiset numerot kuvaavat alkuperäisen näytteen tilavuutta (ml) kyseisessä laimennoksessa. o-merkit osoittavat laimennoksen, jonka mukaan MPN-arvo on laskettu. o-merkki ja pystyviiva kuvaavat virallisiin tuloksiin mukaan otettuja laimennoksia. Kaikkia tuloksia ei voitu käyttää, koska pesäkelukumenetelmällä ei saatu aina tulosta, johon verrata saatua MPN-tulosta.

6.10.2009	
MPN	1,5E+10
P (kpl)	1,0E+00
T (ml)	6,9E-10
N (ml)	6,1E-12
VI (ml)	1,2E-10
VII (ml)	1,4E-11
VIII (ml)	1,5E-12

o

7.10.2009	
MPN	1,1E+11
P (kpl)	2,0E+00
T (ml)	7,7E-11
N (ml)	4,6E-12
VII (ml)	1,4E-11
VIII (ml)	1,5E-12
IX (ml)	1,7E-13

o

8.10.2009	
MPN	1,8E+12
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	8,6E-12
N (ml)	3,4E-13
VIII (ml)	1,5E-12
IX (ml)	1,7E-13
X (ml)	1,9E-14

o

|

16.11.2009	
MPN	9,6E+11
P (kpl)	2,0E+00
T (ml)	8,6E-12
N (ml)	5,1E-13
VIII (ml)	1,5E-12
IX (ml)	1,7E-13
X (ml)	1,9E-14

o

17.11.2009	
MPN	1,1E+12
P (kpl)	4,0E+00
T (ml)	8,6E-12
N (ml)	1,5E-12
VIII (ml)	1,5E-12
IX (ml)	1,7E-13
X (ml)	1,9E-14

o

18.11.2009	
MPN	3,4E+13
P (kpl)	2,0E+00
T (ml)	7,7E-14
N (ml)	4,6E-14
IX (ml)	1,5E-14
X (ml)	1,5E-16
XI (ml)	1,5E-18

o

|



19.11.2009	
MPN	6,2E+15
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	7,7E-14
N (ml)	3,0E-18
IX (ml)	1,5E-14
X (ml)	1,5E-16
XI (ml)	1,5E-18

o

23.11.2009	
MPN	5,3E+16
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	9,5E-17
N (ml)	3,4E-17
XI (ml)	1,7E-17
XII (ml)	1,9E-18
XIII (ml)	2,1E-19

o

25.11.2009	
MPN	1,6E+19
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	9,5E-19
N (ml)	3,8E-20
XII (ml)	1,7E-19
XIII (ml)	1,9E-20
XIV (ml)	2,1E-21

o

27.11.2009	
MPN	5,3E+20
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	9,5E-21
N (ml)	3,4E-21
XIII (ml)	1,7E-21
XIV (ml)	1,9E-22
XV (ml)	2,1E-23

o

1.12.2009	
MPN	3,7E+20
P (kpl)	1,0E+00
T (ml)	9,5E-21
N (ml)	7,5E-22
XIII (ml)	1,7E-21
XIV (ml)	1,9E-22
XV (ml)	2,1E-23

o

2.12.2009	
MPN	3,7E+14
P (kpl)	1,0E+00
T (ml)	9,5E-15
N (ml)	7,5E-16
X (ml)	1,7E-15
XI (ml)	1,9E-16
XII (ml)	2,1E-17

o

4.12.2009	
MPN	1,3E+19
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	1,2E-18
N (ml)	4,6E-20
XIII (ml)	2,1E-19
XIV (ml)	2,3E-20
XV (ml)	2,6E-21

o

7.12.2009	
MPN	6,3E+17
P (kpl)	2,0E+00
T (ml)	1,3E-17
N (ml)	7,7E-19
XIII (ml)	2,3E-18
XIV (ml)	2,6E-19
XV (ml)	2,9E-20

o

8.12.2009	
MPN	8,1E+16
P (kpl)	4,0E+00
T (ml)	1,2E-16
N (ml)	2,1E-17
XII (ml)	2,1E-17
XIII (ml)	2,3E-18
XIV (ml)	2,6E-19

o

10.12.2009	
MPN	4,3E+18
P (kpl)	3,0E+00
T (ml)	1,1E-17
N (ml)	4,6E-20
XII (ml)	1,9E-18
XIII (ml)	2,1E-19
XIV (ml)	2,3E-20

o

16.12.2009	
MPN	8,1E+18
P (kpl)	4,0E+00
T (ml)	1,1E-17
N (ml)	2,3E-20
XII (ml)	1,9E-18
XIII (ml)	2,1E-19
XIV (ml)	2,3E-20

o

17.12.2009	
MPN	2,4E+19
P (kpl)	4,0E+00
T (ml)	1,2E-18
N (ml)	2,3E-20
XIII (ml)	2,1E-19
XIV (ml)	2,3E-20
XV (ml)	2,6E-21

o

#### Liite 4. Kaikki Petrifilm-kasvualustoilla saadut tulokset

Taulukoista näkyy päivämäärät, joina analyysit on tehty sekä kyseisenä päivänä saadut tulokset. Laimennos-sarakkeessa roomalaiset numerot kuvaavat, monesko laimennossarjan laimennos on kyseessä. Yht.-lyhenne kuvaa, paljonko sinä päivänä saatiin laskettua kaikista laimennoksista pesäkkeitä kasvualustoilla yhteensä, kuinka paljon alkuperäistä näytettä oli laimennoksissa yhteensä sekä alkuperäisessä näytteessä oleva mikrobimäärä laskettuna pesäkkeiden yhteismäärää ja alkuperäisen näytteen yhteismäärää käyttäen. o-merkki ja pystyviiva kuvaavat virallisiin tuloksiin käytettyjä tuloksia. Kaikkia tuloksia ei voitu käyttää, koska 0-tulos kuvaa kasvun puuttumista, joten on mahdotonta laskea arvoa.

Laimennos ja analyysin päivämäärä	Alkuperäisen näytteen määrä laimennoksessa (ml)	Petrifilm-kasvatusalustalla kasvaneet pesäkkeet (kpl)	Mikrobeja alkuperäisessä näytteessä (PMY/ml)
IV(6.10.)	1,0E-08	29	2,9E+09
V(6.10.)	1,1E-09	1	9,0E+08
VI(6.10.)	1,2E-10	0	0,0E+00
yht.	1,1E-08	30	2,7E+09

IV(7.10.)	1,0E-08	43	4,3E+09
V(7.10.)	1,1E-09	1	9,0E+08
VI(7.10.)	1,2E-10	1	8,1E+09
yht.	1,1E-08	45	4,0E+09

IV(8.10.)	1,0E-08	29	2,9E+09
V(8.10.)	1,1E-09	3	2,7E+09
VI(8.10.)	1,2E-10	1	8,1E+09
yht.	1,1E-08	33	2,9E+09

IV(16.11.)	1,0E-08	0	0,0E+00
V(16.11.)	1,1E-09	0	0,0E+00
VI(16.11.)	1,2E-10	0	0,0E+00
VII(16.11.)	1,4E-11	0	0,0E+00
yht.	1,1E-08	0	0,0E+00

IV(17.11.)	1,0E-08	0	0,0E+00
V(17.11.)	1,1E-09	0	0,0E+00
VI(17.11.)	1,2E-10	0	0,0E+00
VII(17.11.)	1,4E-11	0	0,0E+00
yht.	1,1E-08	0	0,0E+00

V(18.11.)	1,4E-07	33	2,4E+08
VI(18.11.)	1,5E-08	3	2,0E+08
yht.	1,5E-07	36	2,4E+08

IV(19.11.)	1,1E-07	159	1,4E+09
V(19.11.)	1,2E-08	18	1,5E+09
VI(19.11.)	1,4E-09	1	7,3E+08
VII(19.11.)	1,5E-10	0	0,0E+00
yht.	1,2E-07	19	1,5E+08

IV(23.11.)	1,1E-07	0	0,0E+00
V(23.11.)	1,2E-08	0	0,0E+00
VI(23.11.)	1,4E-09	0	0,0E+00
VII(23.11.)	1,4E-11	0	0,0E+00
yht.	1,2E-07	0	0,0E+00

IV(25.11.)	1,1E-07	0	0,0E+00
V(25.11.)	1,2E-08	0	0,0E+00
VI(25.11.)	1,4E-09	0	0,0E+00
VII(25.11.)	1,5E-10	0	0,0E+00
yht.	1,2E-07	0	0,0E+00

IV(27.11.)	1,1E-07	0	0,0E+00
V(27.11.)	1,2E-08	0	0,0E+00
VI(27.11.)	1,4E-09	0	0,0E+00
VII(27.11.)	1,5E-10	0	0,0E+00
yht.	1,2E-07	0	0,0E+00

IV(1.12.)	1,1E-07	0	0,0E+00
V(1.12.)	1,2E-08	0	0,0E+00
VI(1.12.)	1,4E-09	0	0,0E+00
VII(1.12.)	1,5E-10	0	0,0E+00
yht.	1,2E-07	0	0,0E+00

IV(2.12.)	1,1E-07	149	1,3E+09
V(2.12.)	1,2E-08	7	5,7E+08
VI(2.12.)	1,4E-09	2	1,5E+09
VII(2.12.)	1,5E-10	0	0,0E+00
yht.	1,4E-08	9	6,5E+08

V(4.12.)	1,4E-07	55	4,0E+08
VI(4.12.)	1,5E-08	4	2,6E+08
VII(4.12.)	1,7E-09	0	0,0E+00
VIII(4.12.)	1,9E-10	0	0,0E+00
yht.	1,5E-07	59	3,8E+08

IV(7.12.)	1,2E-06	52	4,2E+07
V(7.12.)	1,4E-07	9	6,6E+07
VI(7.12.)	1,5E-08	0	0,0E+00
VII(7.12.)	1,7E-09	0	0,0E+00
yht.	1,4E-06	61	4,4E+07

V(8.12.)	1,4E-07	70	5,1E+08
VI(8.12.)	1,5E-08	10	6,6E+08
yht.	1,5E-07	80	5,2E+08

V(10.12.)	1,4E-07	42	3,1E+08
VI(10.12.)	1,5E-08	5	3,3E+08
VII(10.12.)	1,4E-07	0	0,0E+00
yht.	2,9E-07	47	1,6E+08

o

IV(16.12.)	1,2E-06	220	1,8E+08
V(16.12.)	1,4E-07	20	1,5E+08
VI(16.12.)	1,5E-08	3	2,0E+08
VII(16.12.)	1,7E-09	0	0,0E+00
yht.	1,5E-07	23	1,5E+08

o

V(17.12.)	1,4E-07	156	1,1E+09
VI(17.12.)	1,5E-08	10	6,6E+08
VII(17.12.)	1,7E-09	4	2,4E+09
yht.	1,7E-08	14	8,3E+08

o